

Protein G ChIP 试剂盒**Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Kit, Protein G Agarose****产品信息**

货号	产品名称	规格
FI8902-12T	Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Kit, Protein G Agarose	12 次
FI8902-24T	Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Kit, Protein G Agarose	24 次
FI8902-40T	Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Kit, Protein G Agarose	40 次

产品描述

染色质免疫共沉淀 (ChIP) 是研究体内 DNA 与蛋白结合的技术。先用甲醛交联细胞内的“蛋白-DNA”复合物，裂解细胞后，用超声波破碎 DNA 至适合的长度，采用特异性抗体捕获细胞内的诱饵蛋白及其结合的 DNA 片段，再加入 protein G 树脂沉淀“抗体-诱饵蛋白-结合 DNA”复合物，随后将蛋白与 DNA 解交联，提取结合的 DNA。该 DNA 可用于后续的定量 PCR 检测 (qPCR) 或高通量测序 (seq)。

试剂盒组分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	40T 规格	储存条件
①	Protein G 树脂	500 μ L	1 mL	1.7 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
②	裂解缓冲液	7 mL	14 mL	22 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
③	漂洗液	25 mL	50 mL	80 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
④	洗脱缓冲液	400 μ L	800 μ L	1.3 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
⑤	10xTE 缓冲液	550 μ L	1.1 mL	1.7 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
⑥	NaCl (5M)	260 μ L	520 μ L	840 μ L	4 $^{\circ}$ C, 1 年
⑦	蛋白酶抑制剂	190 μ L	380 μ L	610 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑧	RNase A	130 μ L	260 μ L	420 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑨	Proteinase K	130 μ L	260 μ L	420 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑩	10 mL 离心管	1 个	1 个	1 个	—

***注意:** 该试剂盒包含足够完成 12、24 或 40 个反应的试剂，每个反应使用 40 μ L 树脂。由于每次 IP 实验至少需要设置一个实验组和一个阴性对照组，因此一次 IP 至少需要使用 2 个反应的试剂量。

额外所需材料

1. 自备试剂：诱饵蛋白 IP 级别抗体（最好是 ChIP 级别抗体）、Normal IgG、PBS、甲醛、甘氨酸、无水乙醇、80%乙醇、苯酚、氯仿、异戊醇、ddH₂O。
2. 所需仪器：混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪。

使用说明

I 注意事项

1. 请勿干燥、冷冻或剧烈涡旋树脂，这些操作可能会引起树脂聚团，降低结合活性。
2. 为保证树脂均匀分布，请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀树脂。
3. 在吸取树脂前，请将移液枪枪头尖部剪掉 1~2mm。
4. 实验的具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，可能需要优化才能得到最大产量。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

II 实验前准备工作

细胞交联

- (1) 每组取 3×10^7 个细胞，预冷的 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4°C 1000 g 离心 5 min 收集沉淀。
- (2) 加入 10 mL PBS（含 270 μ L 37% 甲醛，甲醛终浓度为 1%）重悬细胞，放混匀仪上室温交联 10 min。
- (3) 加入 1 mL 1.375 M 甘氨酸，放混匀仪上室温孵育 5 min，之后将样品置于冰上。
- (4) 4 °C 1000 g 离心 5 min 收集细胞，弃上清。
- (5) 加 10 mL 预冷的 PBS 漂洗细胞 2~3 次，彻底去除交联剂成分，4°C 1000 g 离心 5 min 收集细胞沉淀，液氮速冻 3 min，-80 °C 保存。

III 操作步骤

1. 细胞裂解及染色质超声打断

- (1) 将样本管置于冰上，每组加入 500 μ L ②裂解缓冲液、5 μ L ⑦蛋白酶抑制剂（按 1% 添加），吹打混匀。
- (2) 超声打断染色质，超声过程样品应始终处于冰浴中，并保持较低温度，以防染色质过热变性；超声条件因细胞类型和超声设备而异，请务必提前摸索好合适的超声条件，使 DNA 片段大小在合适范围；摸索超声条件时，可以先固定其他条件，先确定每次超声多长时间不会导致明显发热，再摸索不同的超声次数；需要注意的是每次超声体积和细胞用量最好固定，否则就不能使用一个相对比较固定的超声条件用于后续实验。

【参考条件：非接触式全自动超声波破碎仪，高功率，30 s +30 s（超声 30 s，暂停 30 s）超声 28 轮；接触式超声仪，35% 功率，2 s +5 s（超声 2 s，暂停 5 s）超声 15 min。】

- (3) 4°C 13000 g 离心 10 min，取上清至新的离心管中。
- (4) 取 5 μ L 上清进行解交联（见下述步骤 4，其中⑧RNase A 和⑨Proteinase K 的用量均为 1.5 μ L），并电泳检测 DNA 片段大小。打断的 DNA 通常在 100-1000 bp 中间，ChIP-Seq 要求 DNA 片段最好在 100-500 bp 之

间，ChIP-qPCR 要求 DNA 片段最好在 300~1000 bp 之间。

(5) 如果 DNA 片段化不成功，则将步骤(3)获得的上清液继续超声，直至获得合适大小的 DNA 片段。如果片段化成功，则从上清液中取 30 μ L 作为蛋白 input，取 30 μ L 作为 DNA input，剩余用于 ChIP 实验，-80 $^{\circ}$ C 保存。

* 注意：i. 如果实验组和对照组所用样本一样，可以先一起裂解，取完 input 后再平分为两管。

ii. 如果样本中目标蛋白丰度较低，或结合物间的结合较弱，可以增加初始样本量，同时等比例增加裂解缓冲液和酶抑制剂的用量，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3，体积过大可以更换大规格离心管。

2. 漂洗液准备

为了防止实验过程中的蛋白降解，需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂。取出 ⑩ 10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 3.8 mL ③ 漂洗液和 19 μ L ⑦ 蛋白酶抑制剂（按 0.5% 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。如果有多组样本，请按照实际使用量配置。

3. 染色质免疫共沉淀（ChIP）

(1) 向样本裂解液（步骤 1 制备）中加入诱饵蛋白抗体（按照抗体说明书添加）或 Normal IgG，放混匀仪上室温孵育 1~2 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜；

(2) 将① Protein G 树脂上下颠倒混匀，每组取 40 μ L 树脂到新的离心管中；

(3) 每组加入 200 μ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，500 g 离心 5 min，弃上清；

(4) 重复上步操作一次；

(5) 向树脂中加入步骤（1）的样本&抗体混合物，放混匀仪上 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h；

(6) 4 $^{\circ}$ C 500 g 离心 5 min，弃上清；

(7) 每组加入 500 μ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，4 $^{\circ}$ C 500 g 离心 5 min，弃上清；

(8) 重复上步操作 1 次；

(9) 再次加入 500 μ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，之后取 100 μ L 移入新的离心管中用于蛋白检测（标注为管 1），剩余 400 μ L 用于 DNA 提取（标注为管 2），两管分别 4 $^{\circ}$ C 500 g 离心 5 min，弃上清；

(10) 向管 1 中加入 20 μ L 1 \times SDS-PAGE 上样缓冲液并煮沸 3 min，12000 g 离心 30 s，收集上清至新的离心管中，该 ChIP 样本与蛋白 input 都用于诱饵蛋白的 Western-Blot 检测；

(11) 向管 2 中加入 30 μ L ④ 洗脱缓冲液，涡旋震荡 20s，放混匀仪上室温洗脱 10 min，涡旋震荡 20s，4 $^{\circ}$ C 12000 g 离心 5 min，收集上清至新的离心管中，用于解交联和 DNA 提取。

4. 解交联

(1) DNA Input 和 ChIP 样品置于 65 $^{\circ}$ C 孵育 6 h 或者过夜；

(2) 每管加入 8 μ L ⑧ RNase A，颠倒混匀 10~15 次，37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5~2 h；

(3) 每管加入 8 μ L ⑨ Proteinase K，55 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。

5. 沉淀 DNA

(1) 每管加入 330 μ L ddH₂O、40 μ L ⑤ 10x TE 缓冲液和 400 μ L 苯酚:氯仿:异戊醇混合液（25:24:1），颠倒混匀 10~15 次，室温 13000 g 离心 10 min，转移上层水相到新的离心管中；

- (2) 每管加入 20 μ L ⑥NaCl 和 1 mL 无水乙醇, -20°C 沉淀 2 h 或过夜, 4°C 16000 g 离心 30 min, 去上清;
- (3) 加入 500 μ L 80%乙醇洗涤沉淀, 4°C 16000 g 离心 30 min, 去上清, 开盖晾干乙醇;
- (4) 加入 20 μ L ddH₂O, 溶解沉淀 DNA, -80°C 保存。

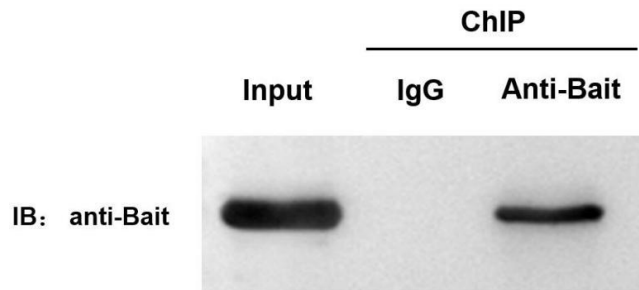
问题解决

问题	可能原因	解决方案
染色质无法打断/太短	交联时间过长/过短	改善交联时长
	超声条件不合适	重新摸索超声条件
获得的诱饵蛋白量少	抗体无法结合诱饵蛋白	更换抗体, 可以选择另一种识别不同抗原表位的抗体
	样品中的诱饵蛋白含量低	提高样本用量
获得的 DNA 量少	样本量不够	提高细胞用量, 或增加细胞量与抗体树脂的比例

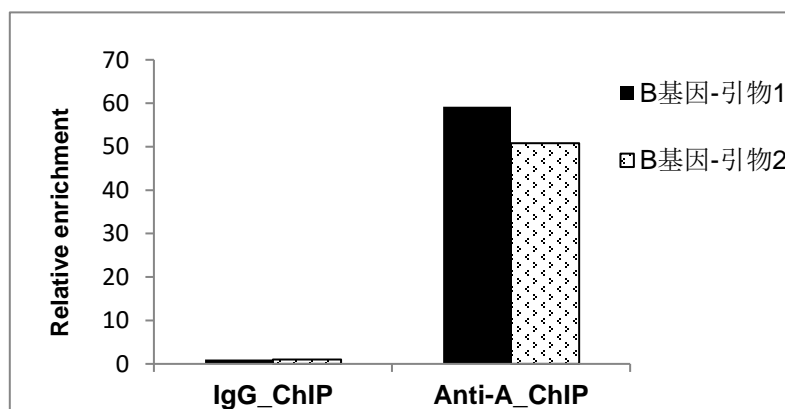
使用案例

实验目标: 检测诱饵蛋白 (A) 和待测 DNA (B) 的结合。

- (1) input: 样本裂解液;
- (2) IgG: normal IgG 的 ChIP 产物 (对照组);
- (3) Anti-Bait: 诱饵蛋白抗体的 ChIP 产物 (实验组)。



诱饵蛋白的 western-blot 检测图



ChIP-qPCR 结果统计图